

- mutants induced in yeast by 1-nitroso-imidazolidone-2 and nitrous acid. — *Z. Vererbungsl.*, 1966, v. 98, p. 106—110.
31. Rosset R., Gorini L. A ribosomal ambiguity mutation. — *J. Mol. Biol.*, 1969, v. 39, N 1, p. 93—112.
 32. Strigini R., Brickman E. Analysis of specific misreading in *Escherichia coli*. — *J. Mol. Biol.*, 1973, v. 75, p. 659—665.
 33. Surguchov A. P., Fominykh E. S., Berestetskaya Iu. V. e. a. Recessive suppression in yeast *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a ribosomal mutation. — *FEBS Letters*, 1980, v. 111, p. 175—178.
 34. Weinstein I. R., Friedman S. M., Ochoa M. Jr. Fidelity during translation of the genetic code. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1966, v. 31, p. 671—681.

ВЛИЯНИЕ ГЕРМЕТИЗАЦИИ И ПЕРЕГРУЗОК НА КЛЕТКИ РАЗЛИЧНЫХ МУТАНТНЫХ ШТАММОВ ХЛАМИДОМОНАДЫ

В. И. ХРОПОВА, Т. И. ИВАНОВА, К. В. КВИТКО,
Г. А. ПРОШНИКОВА, А. А. ФИЛАТОВ

Изучение влияния экстремальных факторов на живые организмы позволяет определить норму реакции генотипа и выявить оптимальный режим существования организмов особенно в тех случаях, когда речь идет об искусственных экологических системах.

Одноклеточные зеленые водоросли давно рассматриваются как возможный компонент замкнутых экологических систем. Чаще других зеленых водорослей в соответствующие эксперименты вовлекают хлореллу. Обладая рядом таких несомненных достоинств, как относительная неприхотливость при культивировании, быстрота размножения и богатые генетические коллекции мутантов, она, однако, не универсальна как объект исследований. К числу недостатков хлореллы, ограничивающих возможности ее применения в качестве компонента замкнутой системы, следует отнести такие ее биологические особенности, как неподвижность клеток, способность усваивать только связанные формы азота, а также агамный способ размножения. Последняя особенность исключает применение мощного по своим разрешающим возможностям метода гибридологического анализа.

Хламидомонада — другой представитель зеленых водорослей — позволяет благодаря особенностям жизненного цикла снять ряд из отмеченных выше ограничений и рекомендовать ее в качестве модельного объекта не только для решения таких фундаментальных проблем, как фотосинтез, генетика клеточных органелл, но и для изучения биологических компонентов замкнутых систем, тем более, что изучение хламидомонады относительно выше, чем у других водорослей.

Здесь будут представлены результаты, позволяющие охарактеризовать нормы реакции одноклеточной водоросли хламидомонады на различные перегрузки (5000 г), на малые перегрузки (5 г) оценить роль герметизации культивирования как фактора сопровождающих экологических экспериментов.

Материал и методика. В качестве исследуемого материала были взяты различные штаммы из коллекции хламидомонады в лаборатории

генетики микроорганизмов Петергофского биологического института Ленинградского университета.

Для оценки роли фактора герметизации культивирования исследованы следующие штаммы: 137С(+), 137С(—), 493, 495, XX-г, XVII-а, СР-2-60, 301-4а, АРГ-2(+), АРГ 7(—), фидер ф (—), ГБ-277. Штаммы представлены формами дикого типа и мутантами, несущими мутации устойчивости к стрептомицину, морщинистости, аукотрофности и др. Штаммы XX-г и XVII-а получены как высоко фертильные в результате внутритетрадного инбридинга в течение 4 поколений [5].

Исследуемые штаммы культивировали в стандартных ампулах объемом 5 мл на среде Л2 с ацетатом (на свету и в темноте). Ампулы запаивали над пламенем спиртовки, каждый раз проверяя герметичность. Контрольные культуры выращивали в незапаянных ампулах. Поведение культур в замкнутых объемах изучали нефелометрированием. Показатели оптической плотности суспензии делящихся клеток снимали при длине волны 550 нм. Измерения проводили непосредственно в ампулах без прерывания опыта по культивированию.

Для оценки влияния экстремальных перегрузок на жизнеспособность клеток были взяты штаммы: СР-2-60 и СТР-2, несущие мутации устойчивости к стрептомицину, НР-неаминрезистентный мутант, штамм дикого типа 494 и прототрофный диплоид Д-101-1. Исходный материал предварительно клонировали, а затем выращивали на стандартной питательной среде Л2 в течение 5—6 дней. Выраженный материал суспензировали в стерильной водопроводной воде. Концентрация клеток в суспензии составляла $2 \cdot 10^6$ — $5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Перегрузки создавали в центрифуге общего назначения ЦЛН-2 при максимальном числе оборотов 8000/мин в течение часа. Центрифугирование проводили в пенициллиновых флаконах, которые заполняли 3 мл суспензии клеток.

После центрифугирования клетки опытных, а также контрольных вариантов высевали в среду Л2 (с ацетатом) в виде штрихов. Учет характера клеточных делений проводили под микроскопом методом учета микроколоний [6]. Чашки Петри с нанесенными штрихами переносили на свет и учет проводили через 0, 24, 48 и 72 час. с момента посева клеток. Количество микроколоний, содержащих 1, 2, 4, 16 и более клеток, определяли как процент от общего числа проанализированных микроколоний. Определяли также величину ошибки при альтернативной изменчивости.

Переход вегетативных клеток в состояние гамет оценивали по их способности образовывать зиготы с гаметами противоположного типа спаривания.

Анализ влияния перегрузок на частоту внутригенной рекомбинации в ядерном локусе проводили на диплоидном салатном светочувствительном штамме Д—38—11. Частоту спонтанных и индуцированных реверсов определяли по количеству вторичных зеленых колоний. Густую суспензию клеток диплоидного штамма смешивали с жидкой средой Л2 и затем разливали по 1 мл в пенициллиновые флаконы с твердой средой Л2 (минимальная). После воздействия перегрузок клетки инкубировали в течение 4 суток в темноте, после чего выставляли на свет. При изучении индуцированного ревертирования на поверхность среды сразу после посева наносили диск с супермутagenом нитрозогуанидином (НГ, доза 1 микрограмм). Флаконы с клетками подвергали перегрузкам (до 5 g) до нанесения НГ и через 1 ч, 4 ч, 24 ч после нанесения НГ. Длительность воздействия — 10 мин. Рассчитывали частоты ревертирования и т. п.

Результаты и обсуждение. Среди физических факторов, определяющих условия существования организмов на Земле, гравитация явля-

ется одним из наиболее постоянных или мало меняющихся в течение тысячелетий [1, 2, 4]. С возникновением космической биологии появляется возможность экспериментального анализа роли гравитации в осуществлении биологических процессов. И одним из подходов в плане решения этих вопросов можно считать изучение последствий более высокой и менее высокой гравитации на различные жизненные функции. Длительная невесомость, когда вес тела уменьшается и фактически почти исчезает, может быть достигнута во время собственно орбитальных полетов. Повышенная гравитация, когда вес тела увеличивается, кратковременно создается при запуске и приземлении космических аппаратов, и длительно на других космических телах, масса которых превышает массу Земли.

Влияние перегрузок на митотическую актив

Время экспонирования, сут	Вариант опыта	Число клеток, взятых на анализ	I споруляция				
			Количество микроколоний				
			1	2	4	8	16
0	Контроль	853	87,3 ± 1,10	9,2 ± 0,96	3,4 ± 0,60	0,1 ± 0,11	
	Опыт	728	91,3 ± 1,04	6,9 ± 0,94	0,9 ± 0,35	0,9 ± 0,34	0,4 ± 0,24
24	Контроль	590	80,6 ± 1,62	11,0 ± 1,29	4,7 ± 0,87	0,5 ± 0,29	—
	Опыт	288	83,6 ± 2,13	9,0 ± 1,65	3,8 ± 1,11	3,1 ± 1,01	
48	Контроль	426	27,4 ± 2,15	18,5 ± 1,87	36,9 ± 2,33	6,4 ± 1,18	0,7 ± 0,41
	Опыт	274	39,7 ± 2,85	18,0 ± 2,25	22,5 ± 2,44	4,3 ± 1,18	
72	Контроль	521	10,5 ± 1,34	12,8 ± 1,46	38,3 ± 2,11	12,4 ± 1,44	6,3 ± 1,06
	Опыт	251	16,2 ± 2,29	11,6 ± 1,99	44,8 ± 3,08	13,0 ± 2,08	3,1 ± 1,07

Примечание. Здесь и далее: контроль — без перегрузок, опыт — перегрузки.

В лабораторных условиях повышенную гравитацию легко создать в обычных лабораторных центрифугах. Сопоставление данных, полученных при различных режимах вращения, позволит прогнозировать приспособленность организмов к таким условиям и осветит некоторые стороны эволюционного процесса в измененном гравитационном поле.

1. Влияние экстремальных перегрузок на вегетативные клетки хламидомонады. В проведенных нами экспериментах штамм СР—2—60 в условиях герметизации, традиционных при экспонировании в космических полетах, оказался наиболее жизнеспособным и легко восстанавливал свои свойства при разгерметизации. Именно поэтому наиболее подробно было изучено влияние перегрузок на этот штамм.

Изучение первых двух споруляции на плотной среде в течение 72 ч от посева показало, что непосредственно после воздействия перегрузок (0 ч) среднее число митотических делений в опыте и контроле весьма сходны (табл. 1). Некоторые различия отчетливо можно зафиксировать через 24 ч после посева и значительные различия — через 48 часов инкубации. На третьи сутки число удвоений клеток у контрольных клеток составило в среднем $1,6 \pm 0,05$, а у опытных — $0,7 \pm 0,03$.

В. При этом отмечена задержка вступления клеток во вторую споруляцию (табл. 1).

Схожие результаты были получены и на хлорелле [3, 7], так как после возвращения из полетов клетки с задержкой вступали в I споруляцию и изменялась длительность каждой споруляции.

Перегрузки наиболее заметно сказались на показателе митотической активности клеток хламидомонады и в меньшей степени на характере самих клеточных делений. Материнские клетки в I и II споруляциях у контрольных и опытных вариантов в большинстве случаев дают 4 дочерних клетки. По мере удаления от момента воздействия перегрузок разница между контрольными и опытными вариантами сглаживается и на третьи сутки практически исчезает.

Принципиально сходные результаты получены при изучении влияния перегрузок на вегетативные клетки штаммов 494, СТР-2, Д-101-1, но отмечены также и некоторые отличия. Деление клеток прототрофного штамма 494 после перегрузок зафиксировано только на 48 ч учета. Однако уже к 72 ч общее количество делящихся клеток в опыте

Таблица 1

ность вегетативных клеток штамма СР-2-60

II споруляция				Доли делящихся клеток, %	с. т	$l \pm m_l$
содержащих клетки						
2	4	8	16			
	—	—	0,13 ± 0,13	3,60 ± 0,63 2,3 ± 0,55	0,16 ± 0,005 0,14 ± 0,01	0,38 ± 0,06
0,7 ± 0,34	1,7 ± 0,53	0,7 ± 0,34	0,34 ± 0,33	19,2 ± 1,77 7,3 ± 1,50	0,39 ± 0,02 0,26 ± 0,03	0,67 ± 0,08
1,4 ± 80,57	3,7 ± 0,91 6,5 ± 1,49	0,3 ± 0,24	4,8 ± 1,03 8,8 ± 1,71	54,5 ± 1,75 42,2 ± 2,88	1,11 ± 0,04 0,42 ± 0,03	0,38 ± 0,03
2,2 ± 0,64 2,3 ± 0,92	10,0 ± 1,30 6,7 ± 1,55	0,5 ± 0,32 2,2 ± 0,91	6,6 ± 1,08	76,5 ± 1,84 72,0 ± 2,78	1,66 ± 0,05 0,71 ± 0,03	0,46 ± 0,02

(92,8 ± 3,97) и контроле (91,9 ± 2,08) одинаково (табл. 2). Задержка вступления во II споруляцию также протекает сходным образом. Штамм СТР-2, несущий цитоплазматическую мутацию устойчивости к стрептомицину и ядерную мутацию аргининзависимости, размножается после перегрузок несколько медленнее, чем штамм СР-2-60, который имеет только аналогичную органелльную мутацию. Вегетативные клетки диплоидного штамма Д-101-1 после воздействия перегрузок размножаются несколько медленнее, чем остальные исследованные штаммы (табл. 2). При этом различия в делении контрольных и опытных вариантов, зафиксированные в первые и вторые сутки, имеют тенденцию сохраняться и на третьи сутки, хотя к этому моменту и сглаживаются, II споруляцию клеток этого штамма в контрольном варианте наблюдаем через 24 ч, а в опыте — только через 72 ч.

2. Влияние экстремальных перегрузок на гаметы хламидомонады. До сих пор в космических полетах исследовали в основном хлореллу, не имеющую полового процесса, поэтому в литературе отсутствуют данные о влиянии космических факторов на гаметы водорослей.

По аналогии с вегетативными клетками хламидомонады мы ожидали изменения характера клеточных делений гамет (возвращающихся в вегетативное состояние) после действия перегрузок. В табл. 2 представлены результаты влияния перегрузок на гаметы гаплондного штамма НР-2, имеющего органелльную мутацию неаминрезистентности. Влияние перегрузок на размножение гамет прототрофного диплоидного

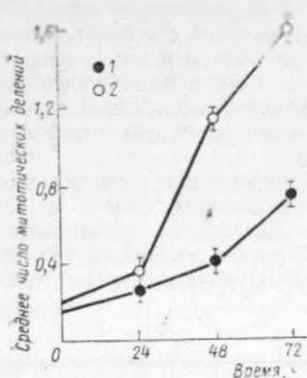


Рис. 1. Митотическая активность клеток шт. CP-2-60 после перегрузок (1) и в контроле (2).

штамма Д-101-1 представлено там же. Это влияние выразилось в небольшом угнетении процесса деления клеток. Сразу же после centrifугирования (0 ч) суммарная доля делящихся клеток диплоидного штамма в контроле составила $3,79 \pm 1,36\%$ а в опыте ($0,5 \pm 0,49\%$). Эта тенденция сохранилась на всем протяжении наблюдений до 72 часов, когда различия исчезают. Также произошло заметное удлинение периода вступления клеток во II споруляцию. Влияние перегрузок на гаметы неаминрезистентного штамма выражено менее контрастно по сравнению с контролем, чем у диплоидного штамма, хотя общую тенденцию к задержке делений в опытных вариантах можно проследить по всем типам микроколоний.

Таблица 2

Влияние экстремальных перегрузок на начало делений вегетативных клеток и гамет различных штаммов хламидомонады

Время учета, ч	Вариант опыта	Доля делящихся клеток, %			
		вегетативн. клетки шт. 494	диплоидного шт. Д-101-1	гаметы шт. НР-2	гаметы диплоидного шт. Д-101-1
0	Контроль	$0,36 \pm 0,36$	$2,91 \pm 1,66$	0	$3,79 \pm 1,36$
	Опыт	0	0	0	$0,5 \pm 0,49$
24	Контроль	$0,32 \pm 0,39$	$7,55 \pm 3,63$	$86,9 \pm 4,05$	$8,96 \pm 2,22$
	Опыт	0	$1,60 \pm 1,56$	$68,64 \pm 5,19$	$3,88 \pm 0,58$
48	Контроль	$37,0 \pm 3,05$	$46,8 \pm 6,24$	$70,7 \pm 2,14$	$25,7 \pm 4,15$
	Опыт	$29,4 \pm 7,81$	$28,2 \pm 6,64$	$68,6 \pm 2,12$	$12,4 \pm 2,26$
72	Контроль	$91,9 \pm 2,08$	$86,4 \pm 5,16$	$92,4 \pm 2,04$	$78,6 \pm 3,54$
	Опыт	$92,8 \pm 3,97$	$69,8 \pm 6,31$	$72,88 \pm 3,33$	$70,2 \pm 4,48$

3. Влияние малых перегрузок (5 г, 10 мин) на частоту внутригенной рекомбинации. Спонтанная частота зеленых реверсов у салатного светочувствительного диплоида Д-38-11, как и при внутригенной рекомбинации в локусе lts_1 , очень низка (табл. 3). Перегрузки также не приводили к возникновению вторичных зеленых колоний. Супермутagen НГ индуцировал реверсы в двух из трех повторностей. Размах изменчивости при этом составил более 100% ($\sigma_1 = 3,03$ и $\sigma_2 = 5,43$). Совместное воздействие перегрузок и НГ почти во всех повторностях приводило к увеличению частоты ревертирования по сравнению со спонтанным уровнем. При этом взаимодействие обоих факторов наиболее эффективно было в тех случаях, когда НГ был добавлен до действия перегрузок. Самостоятельного индуцирующего действия слабых перегрузок не обнаружено, они выступают как модифицирующий фактор.

Полученные нами данные позволяют заключить, что перегрузки как таковые не вызывают необратимых повреждений клеток в вегетативной и гаметной стадии. Это касается малых перегрузок (5 г), которые сами по себе не индуцируют рекомбинационных процессов, но являются модифицирующим фактором при индукции реверсов супермутagenом гидроксиантрацином у светочувствительного салатного диплоида.

Это также касается и больших перегрузок (5000 g), которые вызывают гибель только части вегетативных клеток или гамет, а оставшаяся часть жизнеспособных клеток после снятия воздействия таких перегрузок, легко восстанавливает популяцию. Более серьезные последствия больших перегрузок сказываются на зиготах.

Таблица 3

Возникновение вторичных зеленых колоний у салатного светочувствительного диплоида хламидомонады при действии перегрузок (5g, 10 мин) и нитрозогуанидина (НГ)

Характер действия	Число проб в повторностях			Повторности					
	I	II	III	I		II		III	
				X	σ	X	σ	X	σ
Перегрузки	8	8	8	0	0	0	0	0	0
Перегрузки до НГ	8	12	12	0	0	0,92	1,93	0,58	0,52
Перегрузки через 1 ч после НГ	8	12	12	0	0	10,42	16,94	1,90	2,08
Перегрузки через 4 ч после НГ	8	8	8	2,25	3,15	1,00	1,41	2,25	2,55
Перегрузки через 24 ч после НГ	8	8	8	5,50	11,61	0	0	0,50	1,00
НГ	12	8	8	2,25	3,03	0	0	4,14	5,43
Контроль	8	8	8	0	0	0	0	0	0

Зиготы теряют жизнеспособность с 80 до 20%. Оставшиеся жизнеспособными плохо делятся, образуя значительное число неполных тетрад и октад. Причины этого в настоящее время не исследованы, но в качестве гипотезы можно предложить, что связано это с особенностями цитоскелета у зигот хламидомонады.

4. Влияние герметизации на клетки хламидомонады. Герметизацию культивирования также следует рассматривать как экстремальный режим существования клеток хламидомонады. С такими условиями в естественной среде обитания клетки водоросли никогда не сталкиваются. Тем не менее в настоящее время мы вынуждены рассматривать этот режим культивирования, так как традиционные способы размножения клеток, используемые в наземных лабораторных условиях, в условиях космического полета пока невозможны.

Поведение различных культур хламидомонады в запаянных ампулах оценивали по показаниям нефелометра. В предварительных экспериментах была построена калибровочная кривая зависимости густоты суспензии от показаний прибора (рис. 2). Отсутствие достоверных различий между кривыми, отражающими эту зависимость для разных штаммов, позволило построить общую калибровочную кривую. Каждая точка кривой является результатом 10—15 независимых измерений. Суммарная ошибка не превышала 5,5%.

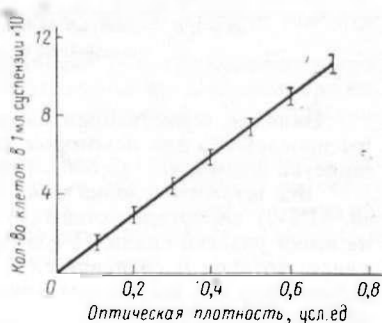


Рис. 2. Калибровочная кривая зависимости густоты суспензии от показаний нефелометра.

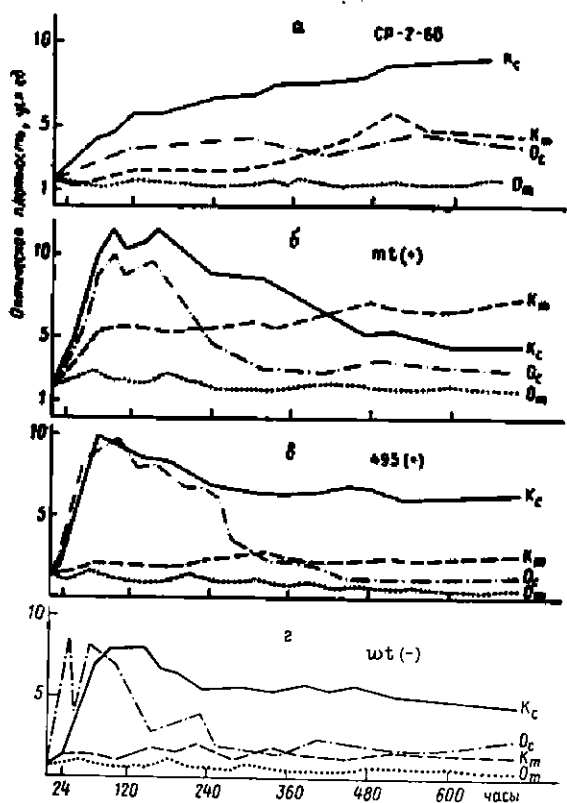


Рис. 3. Кривые нарастания биомассы клеток различных штаммов хламидомонады в условиях герметизации.

а — шт. CP-2-60 (—); б — шт. mt (+); в — шт. 495 (+); г — шт. wt (—); K_c — контроль на свету; K_m — контроль в темноте; O_c — опыт (герметизация) на свету; O_m — опыт в темноте.

Влияние герметизации на жизнеспособность клеток хламидомонады прослежено для некоторых штаммов до 1600 ч (шт. 495), для большинства штаммов — до 600–1000 ч.

Все штаммы условно можно разбить на 2 группы: I группа (CP-2-60, АРГ-2) характеризуется тем, что кривая нарастания биомассы почти не имеет участка спада. После подъема (150–200 ч) кривая выходит на плато, которое и сохраняется в течение более 1000 ч при отмеченных незначительных колебаниях (рис. 3, а). II группа (137 С(+), 493, 495, wt(—), XX-г, XVII-а и др.) характеризуется классической кривой размножения со спадом после интенсивного размножения и последующей стабилизацией (рис. 3, б, в, г).

Недельное пребывание клеток в запаянных сосудах не обнаруживало внешних изменений в поведении культур. Однако позднее культуры постепенно начинали светлеть, оседать и наконец полностью обесцветивались. У некоторых штаммов (495) наблюдали пик «вторичного»

роста и частичное позеленение ранее обесцвечившейся культуры (260ч). Но этот эффект быстро исчезал. Разгерметизация сосудов через месяц после начала эксперимента в ряде случаев (СР-2-60, 495) приводила к интенсивному размножению культур, что свидетельствовало о присутствии в суспензиях жизнеспособных клеток.

Заслуживают внимания различия, которые были обнаружены при сравнении поведения различных культур на свету и в темноте. Во всех случаях темнота существенно понижает способность клеток к размножению, а затем и полностью ее приостанавливает, несмотря на наличие в среде источника углерода.

Пребывание штаммов хламидомонады в запаянных ампулах сопровождалось переходом их клеток из одного физиологического состояния в другое. Во всех случаях в ампулы помещали интенсивно размножающиеся вегетативные клетки. Однако уже на 3—4-е сутки культивирования в запаянных ампулах наблюдали дифференциацию вегетативных клеток в гаметы, что устанавливали по способности части клеток, извлеченных из ампул, образовывать зиготы с гаметами противоположного типа спаривания. При совместном культивировании штаммов (+) и (—) типов спаривания процесс зиготообразования фиксировали еще раньше — на вторые сутки. При этом как гаметогенез, так и зиготообразование на свету происходят весьма интенсивно, а в темноте они идут или значительно медленнее или отсутствуют полностью. Зиготы, возникшие в условиях герметизации, начинают погибать через 10—12 дней пребывания в ампулах. Зиготы контрольного варианта сохраняют жизнеспособность в течение месяца. Деление зигот опытных вариантов сопровождается значительными отклонениями от нормы: зиготы плохо прорастают (в контроле прорастает 80% зигот, в опыте — 20%), резко повышена гибель зооспор после мейоза таких зигот, наблюдается значительная доля неполных тетрат и т. д.

Выводы

1. Экстремальные перегрузки (5000 g) изменяют митотическую активность и длительность споруляций вегетативных клеток и гамет хламидомонады, вызывая одновременно гибель незначительной части клеток. Клетки, сохранившие жизнеспособность, служат основой для восстановления популяции.

2. Малые перегрузки (5 g) не индуцируют рекомбинационных процессов в локусе *fts 1*, но являются модифицирующим фактором при индукции супермутагеном нитрозогуанидином реверсов у светочувствительного салатного диплоида.

3. Герметизация культивирования сохраняет жизнеспособность вегетативных клеток и гамет хламидомонады не более 10 суток на свету. В темноте размножение клеток практически отсутствует. Комплекс факторов при герметизации дифференцирует вегетативные клетки в гаметы и нарушает процесс мейоза в зиготах.

Summary

Influence of germetization and extremal overloads on the viability of cells different mutant stocks in *Chlamydomonas* was studied. It is shown that germetization kill the dividing cells and gametes during the course of one month. The extremal overloads (5000 g) kill small part of the gametes and propagating cells. The cells preserving the viability divided nearly as control. The different type of reaction (the sensitivity) was

found at zygotic stage.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ваулина Э. Н. Влияние невесомости на наследственные структуры. — Проблемы космической биологии. Гравитация и организм. М., 1976, т. 33, с. 174—199.
2. Дубинин Н. П. Проблемы космической генетики. — Изв. АН СССР, 1967, сер. биол., № 5, с. 669—691.
3. Кордюм В. А., Поливода Л. В., Машинский А. Л. Влияние условий космического полета на микроорганизмы. — Проблемы космической биологии. Гравитация и организм. М., 1976, т. 33, с. 238—260.
4. Смитт А. Г. Основы гравитационной биологии. — В кн.: Основы космической биологии и медицины. М., 1975, кн. 1, с. 141—170.
5. Хропова В. И. Материалы III Всесоюзного съезда генетиков и селекционеров. М., 1977, вып. III, с. 85.
6. Чунаев А. С. Генетическая реконструкция системы светозащиты у зеленых водорослей. Автореф. канд. дис. Л., 1976, 22 с.
7. Шевченко В. А. Исследование жизнедеятельности хлореллы в условиях космического полета. — Космическая биология и медицина, 1976, № 1, с. 25—27.